

Aus dem Röntgeninstitut (Leiter: PD Dr. H. J. KAUFMANN)
der Universitäts-Kinderklinik Basel
(Direktor: Prof. Dr. A. HOTTINGER)

**Eine neue Methode
zur intravenösen Applikation von Flüssigkeiten
in die Nabelgefäße neugeborener Ratten**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der gesamten Heilkunde
der Medizinischen Fakultät der Universität Basel

Vorgelegt von
HEINZ PROBST
von Reigoldswil (BL)



BASEL (Schweiz)

S. KARGER

NEW YORK

Von der Medizinischen Fakultät Basel genehmigt auf Antrag
von Prof. Dr. A. HOTTINGER

Tag der Promotion: 29. Juni 1965

Erschienen in *Biologia Neonatorum* 7: 280-289 (1964)

In Dankbarkeit
meinen lieben Eltern gewidmet



Digitized by the Internet Archive
in 2026



https://archive.org/details/IA41546702_0033

Eine neue Methode zur intravenösen Applikation von Flüssigkeiten in die Nabelgefäße neugeborener Ratten¹

H. PROBST

I. Einleitung

Die intravasale Applikation von Röntgenkontrastmitteln zu verschiedensten diagnostischen Zwecken ist heute eine allgemein übliche Untersuchungsmethode. Durch Verbesserung der Präparate sowie technische Verfeinerungen werden die Anwendungsgebiete ständig erweitert. Dies besonders in der Pädiatrie, wo die Abklärung von Mißbildungen durch röntgenologische Darstellung der Gefäße wesentlich bereichert worden ist und immer jüngere Patienten derartigen Untersuchungen zugeführt werden können.

Auf der andern Seite stellen sich Fragen nach dem Schicksal solcher Mittel im Organismus. Toxizität und pharmakodynamische Einflüsse (VAN DE BERG) werden sich besonders am Gefäßsystem manifestieren (ZINNER und GOTTLÖB). Während über die Einflüsse auf andere Organe noch sehr wenig bekannt ist, wurden die Mechanismen der Exkretion (DE MARIA *et al.*, MORRIS *et al.*, PORPORIS *et al.*, WILSON)

¹ Diese Untersuchungen wurden dank der großzügigen Unterstützung der Firma Hoffmann-La Roche A.G., Basel/Schweiz, und des Instituts für biochemisch-medizinische Forschung, Füllinsdorf (BL)/Schweiz, ermöglicht.

genauer studiert. Da in jüngster Zeit angiographische Untersuchungsmethoden im Neugeborenenalter entwickelt worden sind (KAUFMANN und WEISSER, SAPIN *et al.*), scheint eine zuverlässige Testung der benützten Kontrastmittel ebenso dringlich, zumal in dieser Lebensphase mit spezifischen Reaktionsweisen zu rechnen ist.

Die einzige aus der Literatur ersichtliche Methode zur intravenösen Applikation von Pharmaka in der Neugeborenenperiode beschreibt die Injektion in die subkutane Vene am lateralen Augenwinkel bei noch uneröffneten Lidern bei Ratten und Mäusen (ANDERSON *et al.*). Da diese sich bei neugeborenen Ratten sowie bei der Injektion von Röntgenkontrastmitteln als technisch zu schwierig erwiesen hat, stellen wir uns die Aufgabe, eine zuverlässigere und allgemein anwendbare Technik zu finden, die zugleich auch in Analogie zur neonatalen Angiographie die Nabelvene berücksichtigt. Zusätzlich bestimmten wir in diesem Zusammenhang die größtmögliche Flüssigkeitsmenge, die einer neugeborenen Ratte ohne schädliche Folgen injiziert werden kann. Diese Arbeit befaßt sich mit den damit verbundenen Problemen.

II. Material und Methodik

A. Gewinnung und Vorbereitung der Tiere

Die Untersuchungen wurden an einem Auszuchtstamm von Ratten aus der Tierzuchtfarm Füllinsdorf/BL (Schweiz) durchgeführt. Die Tiere werden am mit Äther narkotisierten Weibchen durch Sectio cesarea gewonnen, wobei die möglichst genaue Bestimmung des Geburtstermins eine ausschlaggebende Rolle spielt; die durchschnittliche Tragdauer vom Zeitpunkt der Deckung wird mit 22 Tagen $\pm 1-6$ Stunden angegeben (DAVEY). Zu diesem Zeitpunkt lassen sich auf geringen Druckreiz am Abdomen diskrete Bewegungen der Föten auf den durch die Narkose erschlafften Bauchdecken nachweisen, was am freigelegten Uterus noch deutlicher zu beobachten ist. Durch eine kleine Inzision der Uteruswand gegenüber der Plazentahaftstelle werden die Föten sachte herausgepreßt; die Plazenta wird vorsichtig abgelöst, um die Nabelschnur nicht zu verletzen.

Wir halten die Jungen in einer Umgebungstemperatur von 37° C auf einer mit Wasser befeuchteten Unterlage. Sie werden mit Zelloleostoff leicht abgerieben, um die Atmung anzuregen; den gleichen atmungsstimulierenden Effekt beobachtet man auch schon bei

bloßem Zerren der Nabelschnur. Wenn die Respiration auf diese Weise nicht spontan einsetzt, ist die Prognose des Überlebens schlecht, und diese Tiere sollten für die Experimente nicht benützt werden. Erfolgt die Sectio zu früh, so werden die Jungen nicht am Leben bleiben; sie schnappen in unregelmäßigen Intervallen nach Luft; die anfangs rosarote Hautfarbe wird zusehends zyanotischer, und die motorischen Reaktionen auf äußere Reize sind gering.

Zusätzlich muß die Plazenta etwas über das Körperniveau gelagert werden, weil sonst die Tiere ebenfalls nicht überleben. Es mag sich dabei um einen haemodynamischen Faktor handeln (Verbluten in die Plazenta), denn Flüssigkeitsinjektionen in die Nabelvene steigern schlagartig die Vitalität und besonders die Atmungstätigkeit.

B. Ausrüstung und Injektionstechnik

Wir bringen die Injektionslösung in eine Original-Mantoux-Spritze von 0,5 ccm Inhalt, welche zur Erleichterung der genauen Dosierung auf einem Gestell montiert ist. Elektrische Pumpen zu Mikroinjektionen sind in England entwickelt worden und erlauben ein Arbeiten ohne Hilfsperson (ANDERSON *et al.*). Auf den Spritzenkonus wird eine Nadel (Außendurchmesser = 0,4 mm) angeschlossen und diese durch ein 10–15 cm langes Schläuchlein aus Polyaethylen mit einer zweiten Nadel gleichen Durchmessers, aber ohne Spritzenansatz, verbunden (Abb. 1). Zur einfacheren Füllung der Spritze kann diese leicht weggenommen werden. Vor dem Injizieren muß das ganze System total gefüllt sein, weil eine übliche Aspiration von Blut nicht möglich ist und kleinste Luftmengen eine tödliche Embolie nach sich ziehen.

Die Nabelgefäße sind sofort nach der Sectio noch sehr blutreich und dilatiert, was gegebenenfalls durch vorsichtiges Auspressen der Plazenta verstärkt werden kann. Bei längerem Zuwarten trocknen die Gefäße ein, wodurch die Injektion verunmöglicht wird; durch Aufträufeln von physiologischer Kochsalzlösung auf die Plazenta und Nabelschnur kann man diese Obliteration bis zu 30 Minuten hinziehen.

Nun wird an der gestrafften Nabelschnur, die man am besten über eine Fingerkuppe legt, die Nadel in einem möglichst spitzen Winkel in die Nabelvene eingeführt, was nach einiger Übung ohne weiteres gelingt (Abb. 2). Eine Hilfsperson beginnt darauf langsam mit der Injektion, wobei die eindringende Flüssigkeit die Blutsäule nabelwärts zurückdrängt. Dadurch läßt sich sogleich feststellen, ob die

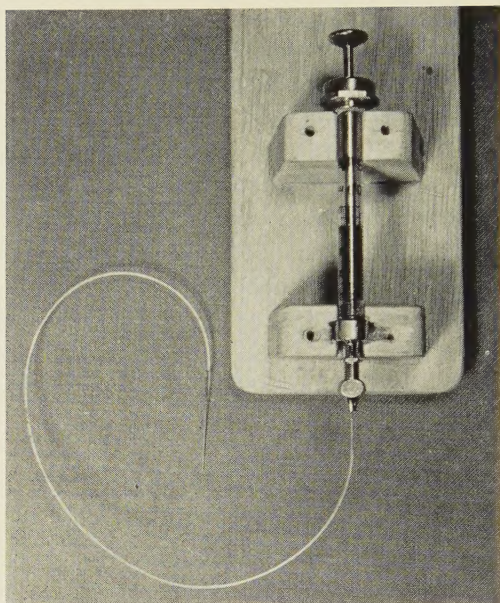


Abb. 1. Instrumentarium zur intravenösen Injektion mit Spritze auf Holzgestell und Injektionsnadel.

Applikation tatsächlich intravenös erfolgt. Andernfalls wird die Nabelschnur bei paravasaler Lage der Nadel wie auch durch allzu schnelles oder stoßweises Injizieren (Gefäßriß!) ödematös aufgetrieben. Demnach hat die Injektion langsam zu erfolgen, was bereits aus haemodynamischen Gründen vorzuziehen ist. Wir wählen für 0,01 ccm (= 1 Teilstrich auf der Mantoux-Spritze) 5 Sekunden. Auf diese Weise kann man neugeborenen Ratten von durchschnittlich 5 g Geburtsgewicht bis 0,2 ccm (= 40 ccm/kg Körpergewicht) physiologische Kochsalzlösung ohne Schädigung injizieren, während bei einer Menge von 0,25 ccm (= 50 ccm/kg Körpergewicht) schon mit Ausfällen zu rechnen ist. Hier tritt nach wenigen Minuten der Tod ein, indem das Tier unregelmäßig nach Luft schnappt und bald schlaff und zyanotisch wird (Tabelle).

Die Nabelschnur wird nach erfolgter Injektion abgeklemmt, an der Basis mit einem Zwirnfaden ligiert und deren Rest mit der Plazenta abgetrennt.

Nach einiger Praxis ist es durchaus möglich, solche Versuche auch

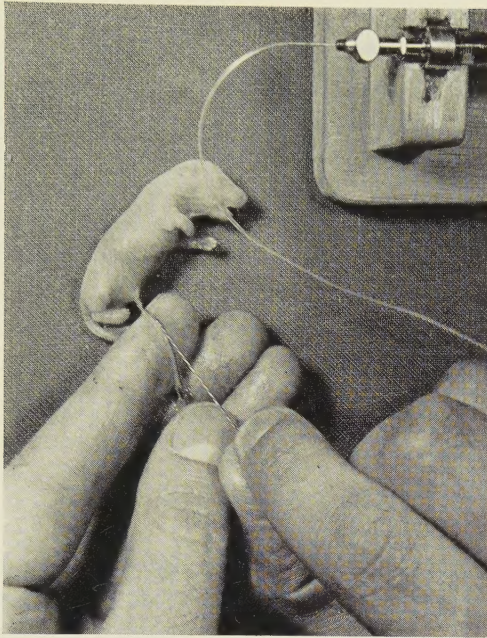


Abb. 2. Injektionstechnik: die Nabelschnur liegt gestreckt auf dem Finger, die Nadel ist in die Nabelvene eingeführt, die Placenta wird vom Daumen gehalten.

ohne Hilfsperson durchzuführen. In diesem Fall läßt man das Gestell mit dem Verbindungsschläuchlein weg und injiziert wie üblich direkt in die Nabelvene.

C. Markierung

Es sind verschiedene Möglichkeiten der Markierung kleiner Versuchstiere eingeführt, so Abtrennen von Zehen und Schwanzstücken, Einkerbungen an den Ohren, Brandmarken, Farbstoffmengen auf oder unter die Haut usw. Blutige Methoden lehnen wir ab, weil dadurch die Gefahr des Gefressenwerdens durch die fremde Mutter zu groß ist. Auf die Haut gebrachte Farbstoffe wie Tusche, Tinten u. a. werden durch das Muttertier über Nacht entfernt; mit Pikrinsäure markierte Tiere werden regelmäßig ausgestoßen oder gefressen. Wir wählen

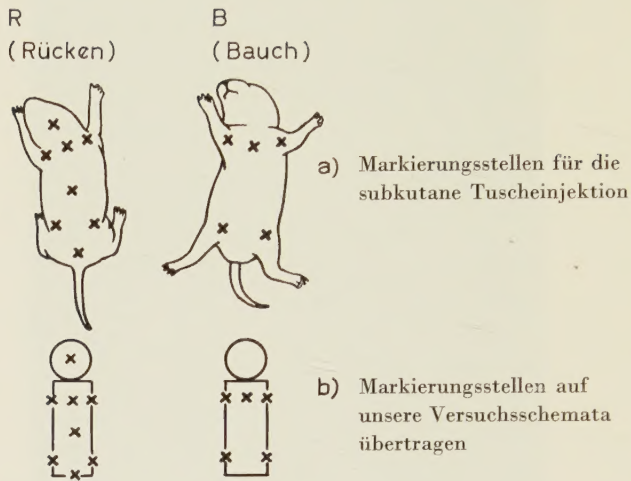


Abb. 3. Schematische Übersicht über die Lokalisation der Tuschemarkierungen: a) am neugeborenen Tier, b) übertragen auf unser Versuchsschema.

daher zur Markierung schwarze Tusche, die in Mengen von 0,005–0,01 ccm mit feinen, gut geschliffenen Nadeln an verschiedenen Stellen des Körpers subkutan appliziert wird (siehe Schema für eine Versuchsserie in Abb. 3). Es ist zu beachten, daß keine größeren Gefäße verletzt werden wegen der Gefahr ausgedehnter Hämorrhagien mit zum Teil tödlichen Folgen.

Diese kleinen, 2 bis maximal 4 mm² großen Flecke sind unverändert gut sichtbar, bis sie durch das sprossende Fell nach etwa 10 bis 12 Tagen überdeckt werden. Je nach Bedarf ist zu diesem Zeitpunkt eine Nachmarkierung mit Pikrinsäureflecken vorzunehmen.

D. Aufzucht

Beim Unterschieben, bzw. Auswechseln des Wurfs, muß jeweils das Muttertier in einen sauberen, separaten Käfig gebracht werden, bevor die eigenen Jungen weggenommen und die neuen in dasselbe Nest gegeben werden. Die Versuchstiere müssen von fremden Stoffen, besonders von Blutspuren, sorgfältig gereinigt werden, was am besten

mit einem in physiologischer Kochsalzlösung getränkten Wattebausch erfolgt. Die Jungen sollen vorerst ein paar Minuten allein im Nest gelassen werden, damit sie den Geruch der Umgebung etwas annehmen. Zusätzlich kann der Geruchssinn des Weibchens irritiert werden, indem man ihm wenige Sekunden einen Wattebausch, getränkt mit Äther oder Salmiakgeist, vor die Nase hält.

Wenn sich das Muttertier nach Zusetzen um die Jungen kümmert und sich über diese bettet, so ist mit einer erfolgreichen Annahme zu rechnen, ansonst nach spätestens einer Stunde eine andere Amme durch gleiches Vorgehen ausgewählt werden muß. Die beste Zeit des Unterschiebens, auch in bezug auf die Laktationsfähigkeit, wird mit 48–72 Stunden angegeben.

III. *Resultate und Diskussion*

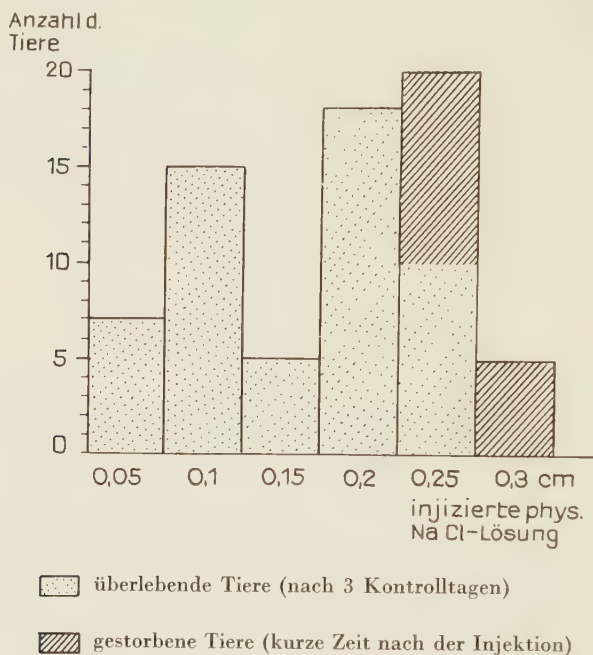
Nach mehrmonatiger Anwendung der Methode ergab sich eine stets vollständige Ausnützung der Tiere für die Versuche und nur selten traten Versager auf. Wir unterlegten jeweils 9 Tiere, so daß durch die überzähligen Jungen die Sicherheitsquote noch mehr garantiert wurde. In diesem Zusammenhang sei auch darauf hingewiesen, daß in einem Wurf hin und wieder ein Tier gegenüber den andern deutlich kleiner ist. Solche Fälle sind beschrieben und als sogenannte «Runs» bezeichnet worden (McLAREN und MICHIE). Es versteht sich von selbst, daß solches Material ausgeschieden wird.

Bei exaktem Vorgehen ist die beschriebene Methode sehr zuverlässig und einfach zu erlernen. Zur Testung verabreichten wir physiologische Kochsalzlösung in steigenden Dosen (0,05; 0,1; 0,15; 0,2 ccm). Jedes Muttertier erhielt insgesamt 9 Neugeborene unterschoben, wovon jeweils 3 Tieren die gleiche Dosis injiziert wurde und ebenfalls 3 sonst gleich gehaltene, aber unbehandelte Neugeborene als Kontrollen figurierten. Die Bestimmung des maximal injizierbaren Flüssigkeitsvolumens im Neugeborenenalter zeigt dabei, daß bei der Prüfung toxischer Substanzen haemodynamische Faktoren keine Rolle spielen, weil hier die Mengen weit unter diesen Werten liegen.

Die Injektionsmethode durch Punktion der Vene am lateralen Augenwinkel innerhalb der ersten 24 Stunden nach der Geburt der Ratten hat sich nach unseren Erfahrungen weniger bewährt. Einerseits ist das Anstechen der Gefäße trotz Applikation von Paraffinöl oder Glycerin an der Injektionsstelle erheblich schwieriger, und

TABELLE I

Prüfung des Grenzwertes des ohne Schädigung verträglichen Volumens physiol. NaCl-Lösung für die neugeborene Ratte bei intravenöser Applikation



andererseits ist gehäuft mit massiven Blutungen zu rechnen. Gerade aus diesem Grunde erscheint die Injektion in die Nabelvene vorteilhafter, und dies wiegt die größeren Anforderungen in bezug auf die Gewinnung der Tiere sicher auf.

Im Rahmen der gesamten Fragestellung wurde auch versucht, bei frisch geworfenen und vom Muttertier bereits abgenabelten Jungtieren die Nabelvenen zu katheterisieren. Dabei wurde zuerst der Nabel durch Entfernen des kleinen Verschlusskoagulums angefrischt und dann durch diese Öffnung ein Polyäthylenschläuchlein (Außendurchmesser von 0,4 mm) vorsichtig eingeführt. Dies gelang jedoch wegen der äußerst feinen Wandstrukturen der engen Gefäße nur selten; entweder wurde das Gefäß lädiert und die injizierte Flüssigkeit

floß in die freie Bauchhöhle, oder es kam zu Blutungen aus dem Nabelstumpf nach Entfernen der Kanüle.

Die Markierung mit unverdünnter schwarzer Tusche subkutan und in kleinsten Mengen erwies sich als zuverlässig und führte nie zur Annahmeverweigerung durch die Ammenmutter oder zu sonstigen Schädigungen. Einzig bei Tieren, denen ein größeres Gefäß am Extremitätenansatz angestochen worden war, kam es zu massiven lokalen Blutungen mit teilweise tödlichem Ausgang. Durch entsprechende Sorgfalt lassen sich solche Zwischenfälle vermeiden. Zusätzlich gestattet diese Methode eine große Zahl von Markierungsmöglichkeiten, so daß die Tiere jederzeit gut unterschieden werden können.

Zusammenfassung

Beschreibung einer neuen Methode zur einfachen und zuverlässigen Injektion von Flüssigkeiten in die Nabelvene bei durch Sectio gewonnenen Ratten. Dieses Vorgehen wurde ausgearbeitet zum Studium der akuten Toxizität von intravenös zu verabreichenden Pharmaka bei Tieren im Neugeborenenalter.

Summary

A new, simple and reliable method of injecting fluids into the umbilical vein of operatively delivered newborn rats is described. This method was developed in order to study the toxicity of intravenous drugs in newly born animals.

Résumé

Méthode nouvelle simple et satisfaisante d'injection de liquide dans la veine ombilicale chez les rats nouveau-nés après césarienne. Etude de la toxicité des produits par voie intraveineuse chez les animaux nouveau-nés.

Literatur

- ANDERSON, N. F.; DELORME, E. J.; WOODRUFF, M. F. A. and SIMPSON, D. C.: An improved technique for intravenous injection of newborn rats and mice. *Nature* 184: 1952-1953 (1959).
- DAVEY, D. G.: Establishing and maintaining a colony of specific pathogen free mice, rats and guineapigs. *LAC Collected Papers* 8: 17-34 (1959).

- DE MARIA, W. J. A.; KRUEGER, R.; SANDERS, A. P. and BAYLIN, G. J.: Tubular loading as a means of improving the radiorenogram. *Amer. J. Roentgenol.* 90: 157-158 (1963).
- KAUFMANN, H. J. und WEISSER, K.: Die transumbilikale Aortographie und selektive Angiographie im Neugeborenenalter. *Fortschr. Röntgenstr.* 98: 699-704 (1963).
- MCLAREN, A. and MICHIE, D.: Ciba Foundation Symposium on Congenital Malformations (Churchill, London 1960).
- MORRIS, S. E.; LASSER, E. C.; FISHER, B. L.; LEE, S. H. and GRANKE, R. C.: A comparative experimental approach to contrast materials in renal angiography. *Radiol.* 77: 764-775 (1961).
- PORPORIS, A. A.; ELLIOT, G. V.; FISCHER, G. L. and MUELLER, C. B.: The mechanism of Urokon excretion. *Amer. J. Roentgenol.* 72: 995-1003 (1954).
- SAPIN, S. O.; LINDE, L. M. and EMMANOULIDES, G. C.: Umbilical vessel angiography in the newborn infant. *Pediatr.* 31: 946-951 (1963).
- VAN DE BERG, A.: Toxicité et action pharmacodynamique de quelques produits de contraste radiologiques hydrosolubles. *J. Belge de Radiol.* 46: 8-37 (1963).
- WILSON, H. M.: Roentgenological aspects of renal function. *J. of Biol. and Med.* 25: 401-404 (1952).
- ZINNER, G. und GOTTLOB, G.: Die gefäßschädigende Wirkung verschiedener Röntgenkontrastmittel, vergleichende Untersuchungen. *Fortschr. Röntgenstr.* 91: 507-512 (1959).

